

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année Scolaire 1952 - 1953 — N° 9

SUR L'AVITAMINOSE D DU CHIEN

DIAGNOSTIC CHIMIQUE CONTROLE DU TRAITEMENT

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 27 Janvier 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Georges MAYEUX

Né le 11 Août 1924, à HAM (Somme)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Éditeurs

42, quai Gailleton, 42

1953

SUR L'AVITAMINOSE D DU CHIEN
DIAGNOSTIC CHIMIQUE — CONTROLE
DU TRAITEMENT

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année Scolaire 1952 - 1953 — N° 9

SUR L'AVITAMINOSE D DU CHIEN

DIAGNOSTIC CHIMIQUE CONTROLE DU TRAITEMENT

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 27 Janvier 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Georges MAYEUX

Né le 11 Août 1924, à HAM (Somme)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Éditeurs

42, quai Gailleton, 42

1953

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur. M. JUNG.

Professeurs honoraires { BASSET.
DOUVILLE.

PROFESSEURS

Physique, Chimie et Toxicologie, Pharmacie, Hygiène du lait	MM. TAPERNOUX.
Anatomie descriptive des animaux domestiques, Tératologie.	TAGAND.
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière médicale.	JUNG.
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologique, Inspection des viandes	LUCAM.
Parasitologie et Maladies parasitaires, Zoologie appliquée, Botanique, Clinique des maladies parasitaires.	EUZEBY.
Pathologie chirurgicale, Médecine opératoire et Ferrure, Séméiologie, Clinique chirurgicale..	COLLET.
Pathologie médicale des Equidés et des Carnassiers, Séméiologie et Propédeutique, Jurisprudence vétérinaire, Médecine légale, Clinique médicale.	BRION.
Pathologie bovine, ovine, porcine, caprine, Maladie des oiseaux de basse-cour, Séméiologie, Médecine opératoire, Obstétrique, Clinique spéciale..	CUNY.
Maladies microbiennes, Police sanitaire, Microbiologie et pathologie générale, Clinique spéciale.	GORET.
Zootéchnie et appréciation des animaux domestiques, aliments du bétail, agronomie et hygiène des animaux, économie rurale	JEAN-BLAIN.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BARONE, FERRANDO, BERTRAND, JOUBERT, Agrégés
MM. MAGAT, BOST, COULON, FERNEY, FLACHAT

ASSISTANTS

MM. COTTEREAU, VALENTIN.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur MOURIQUAND.
Premier Assesseur : M. le Professeur BRION.
Deuxième Assesseur : M. le Professeur JUNG.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.



A MES PARENTS

Que ce modeste travail soit un
témoignage de ma reconnaissance
et de mon affection.

A MA FEMME

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOURIQUAND

*Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Lyon*

Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence du jury
de notre thèse.

Hommage de respectueuse grati-
tude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BRION

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a bien voulu nous inspirer
le sujet de cette thèse et qui nous
prodigua en maintes occasions ses
excellents conseils.

Nous le remercions et le prions
de croire à notre profond et res-
pectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JUNG

Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a toujours été pour nous un
excellent enseignant et un direc-
teur presque paternel.

SUR L'AVITAMINOSE D DU CHIEN
DIAGNOSTIC CHIMIQUE — CONTROLE
DU TRAITEMENT

INTRODUCTION

La notion de maladies par carence alimentaire d'avitaminoses, est certainement l'une des acquisitions les plus fécondes de la Médecine du xx^e siècle.

En même temps que l'on apprenait à distinguer et à reconnaître les divers symptômes de ces maladies, on apprenait à les guérir. Et les remèdes qui étaient l'objet des plus passionnantes recherches devinrent peu à peu des produits purs et finalement des corps chimiquement définis, de constitution tout à fait inattendue et des plus complexes.

Mais ces substances privilégiées, les VITAMINES, que l'homme et les animaux doivent naturellement trouver dans leur alimentation, à moins qu'ils ne les synthétisent eux-mêmes sous l'action de facteurs externes, comme les radiations solaires, ou obtiennent du métabolisme des micro-organismes qu'ils hébergent dans leur tube digestif, ne se bornent pas à empêcher l'apparition de graves affections, comme le rachitisme. Elles assurent aussi, à des doses convenables

et dans un régime équilibré et possédant une valeur énergétique suffisante, le meilleur entretien et le plus parfait développement de l'organisme.

La détermination de ces doses optima des vitamines s'est récemment beaucoup précisée. En même temps est apparue une marge importante entre ces doses et celles qui suffisent tout juste à éviter l'apparition des symptômes typiques d'avitaminose. Et l'on peut envisager maintenant entre l'état d'avitaminose proprement dite et celui de la meilleure santé possible une série d'états intermédiaires, dépendant d'un apport alimentaire plus ou moins restreint en vitamines et que l'on peut appeler pré-carences ou pré-avitaminoses.

Cette notion de pré-carence devient même tout à fait prépondérante pour la Médecine moderne. Mais comme toutes les acquisitions récentes, les bases en sont encore fragiles et les données très restreintes.

En particulier si la symptomatologie d'avitaminose D est bien connue chez l'homme comme chez les animaux, il s'agit toujours de signes de gravité plus ou moins grande, même ceux que l'on range sous le nom de rachitisme floride dénotent un rachitisme déclaré, mais non pas un état de pré-carence.

La nécessité d'un test précoce était évidente car la thérapeutique par la vitamine D ne peut guérir complètement le rachitisme vrai. De nombreux auteurs se sont penchés sur cette question. Quoique la chimie et la structure de la vitamine D soient bien connues, sa recherche et son dosage dans les tissus et les humeurs sont actuellement impossibles.

En l'absence d'un test direct d'avitaminose D, c'est vers le dépistage des signes précoces du rachitisme qu'ont porté tous les efforts.

Le test actuellement utilisé est l'examen chimique du sang et particulièrement le dosage du Ca, du P minéral et du taux d'activité phosphatasique.

C'est sur les conseils de notre Maître, le Professeur BRION, que nous avons entrepris l'étude du pré-rachitisme chez le jeune chien et en suivant ses avis éclairés que nous avons pratiqué des dosages systématiques et contrôlé l'efficacité du traitement par la vitamine D.

CHAPITRE PREMIER

L'AVITAMINOSE D

I. — La Vitamine D.

La vitamine D, vitamine lipo-soluble, encore appelée anti-rachitique, est bien connue depuis les observations de HULDSCHINSKY (1919). Mais ce n'est que plus tard qu'on la distingue de la vitamine A, qu'elle accompagne dans l'huile du foie de morue (MAC COLLUM).

On avait déjà remarqué que les rayons solaires et plus particulièrement les ultra-violets prévenaient les accidents ostéo-dystrophiques. HESS et STEENBOCK constatent que différents aliments, comme les graisses végétales, les grains, acquièrent après irradiation une propriété anti-rachitique qu'ils n'avaient pas avant. On sait que les graisses sont composées, en majeure partie, de glycérides qui ont la propriété, traités par une base, de se transformer en savons (combinaison de la base et des acides gras des glycérides) et en glycérol. Une certaine fraction de la graisse ne subit pas cette saponification : on l'appelle l'insaponifiable. Or, c'est, non dans la matière grasse

proprement dite, formée par les glycérides, mais dans l'insaponifiable de l'huile de foie de morue, que se trouve la substance qui, après irradiation ultraviolette, se transforme en vitamines anti-rachitiques. Cet insaponifiable étant formé de stérols, c'est parmi ceux-ci que partirent les recherches devant aboutir à la synthèse de la vitamine D. Le cholestérol se révéla comme la substance fournissant le maximum de vitamine. Cependant si l'on opère l'irradiation sur du cholestérol très pur, la formation de vitamine est infime. On en vint donc à penser que la vitamine D se formait aux dépens d'une impureté, très voisine chimiquement du cholestérol, et qui le suit dans les opérations d'extraction de ce corps. HESS et STENNBLOCK, WINDAUS, ROSENHEIM et WEBSTER constatèrent que l'ergostérol, stérol découvert depuis longtemps par TANRET dans l'ergot du seigle, fournit par irradiation un produit ayant une haute activité anti-rachitique.

En purifiant le produit ainsi obtenu, REERINK et VAN VIJK (1929), obtinrent les premiers un produit cristallisé ; mais celui-ci n'était pas encore bien défini. Poursuivant leurs travaux dans cette voie, BOURDILLON, ASKEW et WEBSTER, en Angleterre, WINDAUS, LUTTRINGHAUS et DEPPE, en Allemagne, aboutissent à un produit cristallisé, qu'ils regardent d'abord comme la vitamine anti-rachitique ; les Anglais lui donnent le nom de calciférol et les Allemands celui de vitamine D₁. En réalité ces corps sont des mélanges d'isomères, l'un anti-rachitique, le néocalciférol, l'autre inactif, le pyrocalciférol, se formant tous deux lors

de l'irradiation ultra-violette. Presque en même temps, BOURDILLON et WINDAUS les séparent et isolent de même que REERINK et VAN VIJK, un produit pur, homogène qui est la vitamine D2. Les Anglais lui conservent le nom de *calciférol*, qui jusqu'à ces derniers temps était adopté internationalement.

Cependant, rien ne démontrait que chimiquement la vitamine D2 fût bien celle que contenait l'huile de foie de morue, celle que fabriquent les animaux soumis à l'insolation. En somme, la vitamine anti-rachitique naturelle n'était pas encore découverte. On se bornait à assimiler physiologiquement la vitamine D2 au produit auquel les animaux devaient la calcification correcte de leur squelette.

On n'allait pas tarder à mettre en doute cette assimilation physiologique. En effet, pour titrer la valeur d'une préparation anti-rachitique, on procède sur le rat, comme nous le verrons plus loin, par comparaison avec une solution étalon de calciférol. Sur cet animal, les solutions de calciférol et les huiles de foie de poissons ont sensiblement la même action. Par contre, on aboutit à des résultats bien différents quand on opère sur un autre animal, pré-carencable lui aussi, le Poussin. En ce cas, il faut pour le guérir du rachitisme expérimental 30 à 50 fois moins d'Unités internationales quand on se sert d'huile de foie de morue, que quand on se sert de calciférol. De sorte que, dès 1934, WADDELL affirmait que la vitamine D2 n'est pas celle que renferme l'huile de foie de morue. D'ailleurs, il apparaissait probable que les

animaux ne synthétisent pas leur vitamine anti-rachitique à partir d'un stérol (l'ergostérol) qui, de provenance végétale, est pratiquement absent de l'organisme animal. D'autre part, dans les premières expériences d'irradiation on donnait une valeur anti-rachitique au cholestérol non purifié ; et ce cholestérol non purifié, irradié, se comporte comme l'huile de foie de morue vis-à-vis du rachitisme du rat aussi bien que du poulet.

Ainsi les recherches s'orientèrent-elles vers la connaissance de la vitamine D naturelle à partir du cholestérol. L'ergostérol diffère du cholestérol par une double liaison dans la chaîne entre C 22 et C 23. Si l'on sature cette double liaison, la propriété anti-rachitique n'en apparaît pas moins par irradiation. Il semble donc, que cette propriété tient surtout à la présence de doubles liaisons conjuguées, telles qu'elles existent dans le deuxième noyau (noyau B) de l'ergostérol. Les recherches des chimistes visèrent ainsi à créer une seconde double liaison dans le deuxième noyau du cholestérol. WINDAUS et ses collaborateurs LETTRE et SCHENK préparent un dérivé déshydrogéné du cholestérol ; celui-ci ayant perdu un H sur les Carbones 7 et 8 possède ainsi deux doubles liaisons dans la même position que dans l'ergostérol. C'est le *7-déhydrocholestérol*. Il est soumis à l'irradiation et l'on obtient outre d'autres stérols inactifs comme dans le cas de l'irradiation de l'ergostérol, un corps aussi actif que l'huile de foie de morue dans le rachitisme du Poulet et qui est la vitamine D₃. Sa formule a été

établie par WINDAUS, DEPPE et WUNDERLICH. Elle présente une grande ressemblance avec celle de la vitamine D₂. Sa différence d'activité physiologique tient apparemment dans la constitution de la chaîne latérale, plus courte et saturée dans la vitamine D₃.

SCHENK isole, par chromatographie, la vitamine anti-rachitique des huiles de foie de thon et de flétan: biologiquement et chimiquement, elle est semblable à la vitamine D₃ de WINDAUS. On peut donc conclure *que la vitamine D₃ est la vitamine anti-rachitique naturelle.*

Par irradiation du 2-2-dihydroergostérol, WINDAUS et TRAUTMANN ont obtenu un corps appelé vitamine D₄. Son intérêt pharmacologique est moindre parce que moins actif chez le Poulet, il est aussi moins actif chez le Rat.

Au point de vue *physicochimique*, la vitamine D₃ cristallise en aiguilles blanches, fondant à 82-84°. Elle est insoluble dans l'eau, soluble dans les graisses et leurs solvants (éther, acétone, alcool). Elle présente une grande résistance à la chaleur, ce qui permet de l'incorporer à des substrats cuits. Cependant à 200° elle est complètement inactivée. Elle est peu oxydable et se conserve intacte en solution huileuse, si on la soustrait à la lumière et à l'aération dans des récipients bien clos, pendant environ deux ans. Elle est détruite par un excès d'U.V. et par les rayons X. C'est un alcool qui peut donc être estérifié, elle fournit les réactions colorées générales des stérols.

Y. RAOUL et P. MEUNIER ont montré que la solution

chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine (réactifs de Carr et Price) légèrement modifiée par adjonction d'anhydride acétique et d'acide sulfurique, fournit des colorations dont la variation d'intensité en fonction du temps permettent de caractériser les stérols à une double liaison (type cholestérol), à 2 doubles liaisons (type provitamine D) et à 3 doubles liaisons : type vitamines D qui donnent une couleur jaune, courbe descendante.

La *Nomenclature* adoptée par la XVI^e conférence de l'Union Internationale de Chimie pure et appliquée, tenue à New-York les 3-7 septembre 1951, précise que :

1° La substance pure connue jusqu'à présent sous les noms de vitamine D2 ou calciférol, doit être dénommée *ergocalciférol*.

2° La substance pure connue jusqu'à présent sous le nom de vitamine D3 doit être dénommée : *cholécalficiférol*.

Identification : se fait soit par méthode physico-chimique en appliquant la réaction fournie par le trichlorure d'antimoine, soit par méthodes biologiques : elles sont nombreuses, elles consistent toujours en prévention ou cure du rachitisme avec contrôles radiologique ou chimique sur des animaux soumis à un régime rachitigène. Elles ont le plus souvent été effectuées au moyen de jeunes rats et de poulets.

Il faut reconnaître que, déterminée par voie physicochimique, la teneur en vitamines d'un aliment

ou d'un médicament ne donne pas, dans tous les cas, une idée exacte de son efficacité vitaminique, laquelle pourtant, dans le domaine de la nutrition est la valeur qu'il importe le plus de déterminer. Seul le dosage biologique bien appliqué permet de connaître le degré d'efficacité vitaminique d'un produit. Presque toujours le dosage biologique découle logiquement d'observations faites sur l'animal ou sur l'homme. Il est le premier en date. Il a conduit à la découverte du facteur vitaminique.

Titration : le dosage biologique des vitamines D consiste à comparer l'activité de la substance à doser à celle d'une préparation d'activité connue.

La préparation de titre connu peut être de nature assez variée : huile de foie de morue, ergostérol irradié, vitamine D2 ou D3 cristallisées, tous produits soigneusement étalonnés par rapport au standard international. La connaissance de l'activité anti-rachitique de ces substances a donc nécessité un dosage préalable, il vaut donc mieux comparer directement l'activité de la substance à doser à celle du standard international.

L'étalon international de vitamine D est une solution, dans l'huile d'olive, d'ergostérol irradié. L'unité internationale est représentée par un milligramme de cette solution et correspond à 0 γ, 025 de calciférol.

Cet étalon a été adopté en 1931 par le Comité permanent des standards biologiques de la Société des Nations.

A l'époque où il a été fait, ce choix pouvait sembler satisfaisant. Il ne manque cependant pas d'inconvénients. En plus de l'ergocalciférol ou vitamine D2, l'étalon international contient de très faibles quantités d'autres produits d'irradiation de l'ergostérol : lumistérol, tachystérol, suprastérol, toxiatérol. Certains de ces corps sont toxiques, ce qui rend l'étalon international impropre à certaines études de toxicité des vitamines D. De plus, les expériences de GRIDGEMAN, LEES et WILKINSON ont révélé que cet étalon donne des résultats variant avec le test utilisé pour juger de son activité. Aussi, dès 1934, le même Comité de la Société des Nations avait-il envisagé la possibilité d'adopter comme étalon, une solution de calciférol pur dans l'huile d'olive, à une concentration telle qu'un mg. de cette solution contienne 0 γ, 025 de vitamine D2 cristallisée. Cette modification importante qui n'a pas été officialisée ne résolvait d'ailleurs pas la principale difficulté soulevée par l'adoption d'un étalon international de vitamine D.

Des travaux nombreux ont montré que la vitamine D2 ou ergocalciférol, de qui l'étalon international tient son activité anti-rachitique est beaucoup moins active vis-à-vis du Poulet que la vitamine D3 ou cholécalciférol. De ce fait, l'étalon international d'ergostérol irradié ne peut servir à la détermination de l'activité vitaminique des préparations destinées aux élevages des oiseaux de basse-cour.

Vis-à-vis du Rat, les vitamines D2 et D3 possèdent

à poids égal la même activité anti-rachitique. Les travaux d'ELIOT, NELSON, BARNES, BROWNE et JENSS, montrent qu'il doit en être sensiblement de même pour l'homme. Mais vis-à-vis du Poussin, la vitamine D3 est beaucoup plus active que la vitamine D2.

D'après ces faits, il semblerait logique de conclure que l'étalon international devrait être une solution de vitamine D3 ou cholécalciférol. L'usage d'un tel étalon provisoire a déjà été proposé par le British Standard Institution.

On peut toutefois concevoir que cet étalon ne soit pas utilisable dans tous les cas. Aussi, le « Council of Medical Research » de Grande-Bretagne envisage l'adoption de deux étalons internationaux, l'un de vitamine D3, l'autre de vitamine D2 cristallisée, et l'abandon de l'ancien étalon international d'ergostérol irradié.

Cependant, l'étalon international dans sa forme actuelle n'a pas une valeur arbitraire. Une Unité internationale (25 millionièmes de mg. d'ergocalciférol) est la dose qui produit une large bande de dépôt calcaire dans la métaphyse des extrémités proximales des tibias et des extrémités distales des radius du rat rachitique auquel on l'administre quotidiennement pendant huit jours consécutifs.

La vitamine D3 ou cholécalciférol se dose obligatoirement sur le Poulet. La méthode préconisée par l'Association of Official Agricultural Chemists, prescrit l'emploi de poussins Leghorn blancs âgés de 1

à 3 jours ; la technique employée est celle du « line test ». On a l'unité A.O.A.C.

Les Américains estiment qu'en moyenne 100 U.I. de vitamine D₂ (ergocalciférol) correspondent, pour le Poussin, à 1 Unité A.O.A.C.

Au point de vue *thérapeutique*, on emploie la vitamine D sous forme d'huile de foie de morue ou de flétan (souvent enrichie par addition d'ergocalciférol) ou de solutions huileuses d'ergocalciférol pur (vitamine D₂) ou de cholécalciférol (vitamine D₃). Plus rarement on emploie des solutions alcooliques. Cependant, l'emploi des huiles de poissons est loin d'être préconisé à l'heure actuelle. Certains accidents toxiques ont été décrits par divers auteurs, accidents qui tiennent non à une hypervitaminose, mais bien à une action toxique propre de l'huile de foie de morue ou d'autres poissons.

Enfin, il est pratiquement impossible de connaître la quantité de vitamine D qu'on donne aux animaux ; si le Codex impose une teneur minima de 85 U.I. au gr., il n'en reste pas moins que la teneur maxima est très variable avec la nourriture qu'a prise le poisson, avec la saison, avec la méthode de récolte de l'huile, etc... Cette teneur varie donc pour les huiles de commerce, naturelles, et non chargées en vitamine D₂, entre 85 et 250 U.I. C'est pour toutes ces raisons qu'on tend à donner actuellement la faveur aux préparations à base de vitamine D₃ pure. L'intérêt de la vitamine D₃ est d'être parfaitement adaptée aux besoins des animaux. Il est incontestable

ble que c'est elle qu'ils édifient sous l'action des rayons solaires, puisque c'est dans la peau que l'on dose la plus forte teneur en 7-déhydrocholestérol.

La posologie varie suivant les formes médicamenteuses, les voies d'administration, les espèces, l'âge, l'effet recherché curatif ou préventif. L'avantage à employer la vitamine D₃ est qu'elle présente toutes les possibilités thérapeutiques de la vitamine D : elle agit à dose quotidienne, à dose massive, par voie buccale ou parentérales. On emploie alors indifféremment, la voie intra-musculaire ou sous-cutanée et on peut espacer les interventions de 8 à 15 jours.

A titre indicatif, la dose quotidienne sera d'environ 20 Unités par kg. de poids vif chez le chien de petite race ; ce chiffre doit être décuplé au moins pour les chiens de grandes races, Danois, Berger, Bouvier... (d'après A. BRION).

II. — L'ossification et la vitamine D.

1° RAPPEL DE L'ASPECT BIOCHIMIQUE DE L'OSTÉOGENÈSE :

En voici succinctement les différentes étapes :

A) *Formation de la matrice osseuse* : d'origine mésenchymateuse, on ne connaît que fort peu la transformation des protéines en substance pré-osseuse, d'après LEVANDEUR et LACROIX il y aurait intervention d'une substance inductrice ou « ostéogénine ».

B) *Préparation à la calcification* : trois phénomènes interviennent successivement :

1) apparition massive de phosphatases alcalines au niveau des ostéoblastes et des cellules hypertrophiques des cartilages d'ossification ;

2) en même temps que la matrice protéique s'enrichit en phosphore et en calcium, probablement sous forme d'ions PO_4^{--} et Ca^{++} combinés aux protéines ;

3) elle subit rapidement des remaniements qui la rendent apte à fixer du P et du Ca sous forme de phosphoprotéinates de Ca. A ce processus participe, d'après POLONOVSKI et CARTIER, une protéinase du type catheptase.

C) *Précipitation du phosphate tricalcique* : en bref, elle résulte d'un enrichissement local en ions PO_4^{--} et secondairement en Ca^{++} , les premiers provenant de l'action couplée de deux enzymes, dont l'un, la phosphorylase, fournit les substrats phosphoriques; l'autre, la phosphatase, agit sur ces derniers pour en libérer les ions PO_4^{--} . Cette conception cadre avec les constatations faites dans l'os et avec l'expérimentation in vitro ; elle permet également de comprendre l'action de certaines substances tels les fluorures alcalins, qui sont des inhibiteurs des enzymes.

La fixation du phosphate tricalcique aux protéines osseuses se fait par un mécanisme encore inconnu.

2° LES FACTEURS DE LA CHIMIOGÉNÈSE OSSEUSE :

Ils sont multiples, externes et internes.

LES FACTEURS EXTERNES :

Ils comprennent notamment le régime, les conditions d'entretien et certaines vitamines.

— *Le régime* a une importance extrême, l'approvisionnement en Ca et P pour être normal est soumis à des exigences de quantités de proportions et de formes :

a) les besoins minima en Ca et P varient suivant l'espèce et l'âge. La carence de ces éléments compromet la minéralisation de la substance pré-osseuse ; dans ce cas on observe un excès de tissus ostéoïde, caractéristique du rachitisme chez le jeune, de l'ostéomalacie chez l'adulte ;

b) le Ca et le P doivent être fournis en proportions bien déterminées. MAREK et WELLMANN l'expriment sous forme d'alcalinité alcalino-terreuse ou « Erdalkalialkalizität » ou E.A. Plus généralement le rapport phosphocalcique d'un aliment s'exprime par le rapport Ca/P. Sa valeur optimum moyenne, variable suivant les espèces, les races et l'âge oscille autour de 1/1 s'il est exprimé en Ca/P et de 1/1,63 sous la forme Ca 0/P2 05.

La nécessité de ce rapport réside dans les exigences de l'absorption du Ca qui est solidaire de celle du P. Si le rapport Ca/P est inférieur à la normale,

c'est-à-dire si le Ca alimentaire est insuffisant par rapport au P, il sera complètement absorbé et l'acide phosphorique sera libéré en excès, ce qui peut engendrer de l'hyperphosphatémie avec toutes ses conséquences ; cette éventualité peut se réaliser de deux façons, soit par excès de P (hyperphosphorose), soit par insuffisance de Ca alimentaire (hypocalcicose).

Si au contraire le rapport est augmenté, c'est-à-dire si le P alimentaire est insuffisant par rapport au Ca, l'acide phosphorique est utilisé au fur et à mesure de sa libération, mais il est épuisé avant que tout le Ca soit transformé en phosphate monocalcique absorbable. Il s'ensuivra une insuffisance d'absorption affectant surtout le P et aboutissant à de l'hypophosphatémie génératrice de rachitisme ou d'ostéomalacie suivant l'âge.

L'insuffisance de P ou hypophosphorose est une modalité bien connue, l'excès de Ca alimentaire ou hypercalcicose n'est pas encore établi ;

c) la forme chimique du P alimentaire n'est pas indifférente, PETERSEN attira l'attention sur cette notion en démontrant que chez le porc l'avoine et le maïs sont rachitigènes malgré leur haute teneur en P, mais ce P se trouve en réserve sous forme d'acide phytique et n'est libérable que par la phytase, qui n'existe qu'en faible quantité dans ces céréales.

Plus récemment J. COURTOIS et Ch. PEREZ ont confirmé que dans un aliment il n'existe aucun rapport entre la teneur en inositolphosphate d'une part et l'activité phytasique d'autre part. Toutefois l'insuf-

fisance de l'activité phytasique peut être dans une certaine mesure corrigée par la germination, de même que l'on peut compenser la perte de Ca par addition de chaux à la ration.

— *La lumière solaire* joue un grand rôle en mettant les animaux dans les conditions hygiéniques optima, en transformant les stéroïdes cutanés en vitamine D et en stimulant le métabolisme général.

— Parmi les *vitamines*, l'acide ascorbique est indispensable à la formation de la substance préosseuse, la vitamine D favorise l'absorption et la fixation sur les os des matériaux phosphocalciques.

Les vitamines anti-rachitiques sont absorbées par voie buccale et par suite doivent pénétrer dans la circulation générale par la voie intestinale. D'après les expériences de GREAVES et SCHMIDT, il semble que la bile soit le vecteur de la vitamine D.

En effet, ces auteurs opérant sur des rats porteurs de fistules biliaires, ont remarqué que les animaux ne bénéficiaient pas de l'action thérapeutique de l'ergostérol irradié administré par voie orale. Si au contraire, l'ergostérol est administré par voie sous-cutanée, on constate chez les mêmes animaux une action bienfaisante.

La vitamine anti-rachitique a une action thérapeutique lorsqu'elle est administrée par voie sous-cutanée, intra-musculaire, intra-péritonéale, intra-veineuse.

LES FACTEURS INTERNES de la chimiogénèse osseuse :

Ils visent également l'absorption et plus spécialement la différenciation des matériaux nécessaires à la naissance et à la vie de l'os.

— *La phosphatase des os : biochimie normale et pathologique :*

Les phosphatases sont des enzymes libérant l'acide orthophosphorique à partir d'un substrat particulier à chaque type de phosphatase (ester, pyrophosphate, etc.) ; en général, les organes renferment en dehors des diestérases et des pyrophosphatases, un mélange de phosphomonoestérases A1, A2 ou A3, en sorte que ces enzymes exercent simultanément leur action dans les cellules. Toutefois, les os en croissance ne contiennent pratiquement que l'enzyme A1. La dénomination de phosphatase des os désigne la phosphoestérase de ce type en biochimie osseuse.

— *caractères biochimiques :* ROBINSON a établi en 1923 que le squelette des mammifères en croissance contient une phosphatase, mise en évidence depuis lors dans les os et les dents de tous les vertébrés. Cet enzyme est probablement sécrété par les ostéoblastes. Cette phosphomonoestérase A1 hydrolyse un grand nombre d'esters naturels ou synthétiques à un pH optimum de 8,5 à 9,5. Son action, sur les esters naturels dérivés des glucides présente en général un pH optimum de 9,0 à 9,2.

On connaît divers inhibiteurs de l'enzyme des os,

en particulier les oxalates alcalins et à un degré moindre les fluorures. Les acides biliaires et surtout les corps possédant un groupement sulfhydryle (cystéine, etc.) sont les principaux corps pouvant jouer le rôle d'inhibiteur physiologique.

Somme toute, la phosphatase est susceptible de présenter in situ des modifications d'intensité importantes par la mise en jeu de mécanismes encore incomplètement connus.

— *Participation de la phosphatase au mécanisme de l'ossification :*

Seuls les os en voie de formation en sont riches chez le jeune mammifère.

Le groupe de faits le plus suggestif est sans doute celui apporté par l'étude de l'évolution de l'activité phosphatasique au cours de l'ossification de divers organes étudiée principalement par ROUSSEAU et par ROCHE et collaborateurs. La phosphatase est abondante dans les périodes de calcification rapide, elle disparaît quand le rythme de la minéralisation se ralentit. Un exemple caractéristique est fourni par la rotule humaine dont la calcification ne commence que dans la deuxième année de vie ; ce cet organe d'abord dépourvu de phosphatase, en devient riche vers l'âge de deux ans, quand la première phase de calcification apparaît.

L'ensemble de ces faits permet d'attribuer à la phosphatase un rôle important dans les phénomènes d'ossification rapide. Mais il n'est pas sûr que l'enzyme

participe aux calcifications lentes. L'expérience montre, chez le rat, que passé le premier stade de croissance, les os se développent moins rapidement mais s'enrichissent beaucoup en sels.

Après expérience de calcification in vitro des os longs, ROBISON et collaborateurs concluent que la phosphatase est un agent de ravitaillement local en ions phosphoriques.

La phosphatase permet l'accumulation de radicaux phosphoriques dans la substance préosseuse avant la formation du phosphate tricalcique.

— *les phosphatases sériques* : Le sérum contient normalement deux phosphatases, l'une du type phosphomonoestérase II dont le pH est acide, l'autre du type phosphomonoestérase I agit en milieu alcalin et c'est cette dernière qui est beaucoup plus active que la précédente (COURTOIS et PLUMEL).

Les éléments figurés du sang, cellules autonomes, ont une teneur peu variable en enzyme, tandis que le plasma contient le « trop plein » de la phosphatase des divers organes entre autre des os, du rein, de l'intestin, du foie. Une hyperproduction d'enzyme par l'un des organes qui en sont riches se traduit par une hyperphosphatasémie dont la connaissance peut être très utile aux cliniciens.

A. ROCHE et GARCIA, étudiant le rachitisme expérimental chez le rat, observent que la teneur en phosphatase des diverses régions osseuses augmente très rapidement dès le début de l'expérience.

— *Variations physiologiques* : le régime alimentaire n'entraîne que de faibles variations : baisse au cours du jeûne et des déficiences protéiques, augmentation par ingestion de glucides en grosses quantités.

Chez l'enfant on observe une phosphatasémie forte qui va en diminuant ensuite vers l'âge adulte.

— *Variations pathologiques* : les maladies provoquant une ostéolyse comportent en règle générale une hyperphosphatasémie.

Dans les ostéomalacies où le squelette subit une forte perte en sels, l'hyperphosphatasémie est constante (KAY).

Au cours du rachitisme, l'augmentation de la phosphatasémie est constante et apparaît d'une façon précoce.

La phosphatasémie reflète assez fidèlement le pouvoir phosphoestérasique relatif des foyers normaux ou pathologiques de production de l'enzyme.

Cependant, l'interprétation des résultats demeure délicate lorsque les modifications de la phosphatasémie sont faibles, étant donné la multiplicité des origines possibles de l'enzyme. En raison même de celles-ci, des maladies de foie, de rein, des organes hématopoïétiques provoquent une augmentation du taux sérique de la phosphatase au même titre que les maladies osseuses.

III. — Tests d'avitaminose D.

La carence en vitamine D comme aussi son administration se traduit dans le sang, d'une part par des modifications du nombre d'unités par 100 cc. de sérum et d'autre part, par des modifications de taux de calcium, de phosphore et de la phosphatase.

Les premières constituent les signes directs, les secondes les signes indirects.

— *Les signes directs* : le dosage de la vitamine D dans le sang n'est pas réalisable de façon pratique. WARKANY a mis au point un procédé de dosage qu'il a employé chez l'enfant, puis chez l'adulte en collaboration avec GUEST et GRABILL.

Le sérum sanguin est desséché, mis en ampoule, conservé au froid, puis essayé sur le rat rachitique (méthode du « line test »). Cette excellente méthode a permis aux auteurs de déterminer les normales, mais elle demande pas mal de sang, de nombreux animaux et surtout beaucoup de temps.

Il existe encore une autre méthode de dosage de la vitamine D, cette méthode très complexe et fort délicate consiste, après extraction convenable, à faire un dosage spectrophotométrique ; il s'agit d'un procédé qui demeure dans le cadre de la recherche pure, il ne saurait être question de son application en série sur les petites quantités de sang que nous utilisons.

— *Les signes indirects* : les signes indirects sont

par contre, d'une détermination plus aisée et plus rapide, mais ce qui importe c'est d'en estimer la valeur comme test d'hypo-vitaminose, tout en se rappelant constamment que ces tests ne sont plus spécifiquement liés à l'apport de vitamine D : il s'agit de variation du calcium, de phosphore minéral libre, de la phosphatase dans le sérum.

Il y a peu de travaux comparant la signification des signes directs et indirects.

Les expériences de WARKANY, GUEST et GRABILL révèlent une discordance importante au cours de l'ingestion de fortes doses de vitamine D et son reflet dans le sérum. Ainsi, le taux de la vitamine D dans le sérum peut ne pas constituer un test fidèle.

H. STANDSTEDT et K. SJOBERG ont montré que lorsque l'on n'administre pas de vitamine D, le calcium et le phosphore diminuent dans le sérum des porcs lorsqu'ils sont absents de l'alimentation, mais que dans les deux cas il se produit une augmentation de phosphatases : cette augmentation est généralement très grande, tandis que la réduction de la calcémie est souvent légère.

Une diminution de phosphorémie et une augmentation de phosphatase sont l'indice d'une carence en P.

Une calcémie normale, une phosphorémie élevée et une augmentation de phosphatase indiquent une carence en Ca.

L'analyse du sérum peut donc indiquer ces carences avant tout symptôme clinique.

Ces altérations sont plus prononcées chez les jeunes porcs. En administrant de la vitamine D, les différences s'effacent et l'analyse du sérum ne donne aucun indice.

KLASMER (1944) a fait une observation qui met en évidence d'une façon particulièrement claire la relation entre la vitamine D et la phosphatase : le taux de celle-ci varie selon la saison, il s'élève en hiver, s'abaisse en été et atteint sa concentration minima en automne. Par l'intermédiaire de la vitamine D, la phosphatasémie est donc réglée par l'irradiation U.V.

CHAPITRE II

METHODES DE DOSAGE UTILISEES

I. — Dosage du calcium.

MÉTHODE DE KRAMER ET TISDALL, MODIFIÉE PAR CLARK ET COLLIP

Par une première centrifugation on sépare du sang citraté le plasma. Une deuxième centrifugation nous a été souvent nécessaire pour clarifier complètement le plasma.

A 2 cm³ de plasma prélevé avec une pipette très exactement graduée, on ajoute 1 cm³ d'oxalate d'ammonium en solution saturée, c'est-à-dire titrant 6 p. 100, et 2 cm³ d'eau distillée. Le mélange est agité soigneusement avec une baguette de verre étiré, en général nous laissons reposer la nuit, puis le calcium du plasma étant passé à l'état d'oxalate de calcium, on centrifuge à 3.000 tours pendant 3 minutes. Le liquide clair est décanté et le précipité est lavé 3 fois avec 4 cm³ d'une solution d'ammoniaque à 2 p. 100, en centrifugeant 10 minutes les deux premières fois, 5 minutes la troisième fois et en décantant chaque fois.

Le précipité est alors dissout dans 2 cm³ d'SO⁴H² N/1 (49 gr. par litre) et mis au bain-marie bouillant, de façon que le mélange à l'intérieur du tube à centrifugation soit à une température d'au moins 60°.

Le titrage du calcium se fait à l'aide d'une solution de permanganate de potasse N/100 (c'est-à-dire 10 cm³ d'une solution N de Mn O⁴K pour 990 cm³ d'eau distillée) et d'une pipette graduée au centième, en laissant tomber la solution titrée goutte à goutte jusqu'à l'apparition de la coloration rose persistante.

Calcul :

Du chiffre trouvé, déduire la quantité de permanganate de potasse N/100 nécessaire pour colorer de l'eau distillée (environ 0.02 cc.) égale au volume de la solution.

La quantité totale de permanganate employée est alors de :

$$n \text{ cm}^3 - 0 \text{ cm}^3 02.$$

Comme 1 cm³ de la solution N/100 de permanganate de potasse correspond à 0 mg. 2 de calcium, il est facile d'en tirer le taux du Ca par 1.000 cm³ de plasma :

$$(0,2 n - 0,02 \text{ pour } 2 \text{ cm}^3 \text{ de plasma} \\ \text{pour } 1.000 \text{ cm}^3 \text{ 50 fois plus, soit : } 100 (n - 0,02).$$

Nos dosages ont été faits en double dans des conditions identiques avec les mêmes pipettes et une solution de permanganate de potasse souvent vérifiée et

renouvelée, étalonnée à partir d'acide oxalique normal.

II. — Dosage du phosphore minéral et des phosphatases du sang.

MÉTHODE DE A. BODANSKY, MODIFIÉE PAR PAUL MEUNIER
ET YVES RAOUL

Principe :

Dosage parallèle du phosphore minéral du plasma avant et après addition d'un substrat renfermant un large excès de glycérophosphate de sodium. La différence de phosphore minéral constatée entre les deux dosages mesure l'hydrolyse effectuée par les phosphatases du sang.

Mesure de l'activité phosphatasique :

Nous nous sommes arrêté à la technique proposée par Paul MEUNIER en raison de sa relative simplicité et de la possibilité que nous avons d'employer un électrophotomètre de sa conception :

1° On opère sur le plasma afin d'éviter les phénomènes de phosphominéralisation autonome du sang provenant de l'hydrolyse des esters phosphoriques des globules.

2° On fait agir la phosphatase du plasma qui serait surtout une phosphatase β sur le β -glycérophosphate de sodium et dans les conditions optima d'action,

c'est-à-dire pH : 8,5 à 38° ainsi qu'il est réalisé dans la technique de BODANSKY à l'aide d'un tampon de diéthylbarbiturate sodique (il n'a pas, aux doses utilisées, d'action inhibitrice sur les phosphatases P. MEUNIER).

3° On se contente d'un temps d'action de 1 heure dans une étuve à thermostat, de manière à éviter une disproportion trop grande et préjudiciable au dosage entre les quantités de P minéral préexistant et néoformé. De cette manière, même dans les cas de très grande activité phosphatasique, l'enzyme se trouve toujours en présence d'un grand excès de substrat. Les conditions d'action se trouvent ainsi aussi identiques que possible d'un sang à l'autre.

4° L'unité adoptée est celle proposée par BODANSKY, la plus répandue actuellement ; elle s'exprime par le nombre de milligrammes de phosphore libérés par 100 cm³ de plasma agissant pendant 1 heure à 38° sur un substrat renfermant un large excès de β -glycérophosphate de sodium à pH 8,6.

Dosage du P minéral :

La méthode la plus sensible, en vue d'un sub-microdosage, est celle qui mesure l'intensité de la coloration bleue du complexe phospho-molybdique réduit. On emploie les réducteurs du type photographique qui permettent la préparation de réactifs de conservation assez longue. Dans les conditions du dosage et aux doses de phosphore rencontrées l'intensité des colorations suit parfaitement la loi de BEER.

Sub-microdosage des phosphatases du plasma :

Réactifs :

1° Substrat de BODANSKY :

Glycérophosphate de sodium	2,5 g.
Diéthylbarbiturate de sodium.....	2,12 g.
Eau bi-distillée q.s.p.	500 cm ³

2° Solution NaCl à 1,8 p. 100.

3° Acide trichloracétique à 25 p. 100,

4° Réactif A :

Molybdate d'ammonium	2,5 g.
Acide sulfurique (5 N)	100 cm ³

5° Réactif B :

Sulfate de monométhylparamido- phénol	0,5 g.
SO ³ NaH à 15 p. 100	195 cm ³
SO ³ Na ² à 20 p. 100	5 cm ³

Toutes les solutions sont faites dans l'eau bi-distillée.

Mode opératoire :

Dans une fiole jaugée de 5 cm³ mélanger :

Fiole T :

Substrat réchauffé	1 cm ³
NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Eau bi-distillée	0,1 cm ³
CCl ³ COOH à 25 p. 100	0,2 cm ³

Dans deux tubes à centrifuger coniques, verser :

Tube I :

NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Plasma	0,1 cm ³

Tube II :

Substrat réchauffé à 38°	1 cm ³
NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Plasma	0,1 cm ³

Laisser le tube II exactement 1 heure à l'étuve à 38°.

Arrêter l'action des phosphatases en mettant le tube immédiatement dans l'eau glacée.

Ajouter dans le tube I : 1 cm³ de substrat, puis dans les tubes I et II :

0,2 cm³ d'acide trichloracétique. Centrifuger.

Décanner dans des fioles jaugées de 5 cm³ ; ajouter au culot 0,1 cm³ d'acide trichloracétique à 25 p. 100. Mélanger, centrifuger, décanter dans les fioles de 5 cm³ correspondantes.

Enfin ajouter dans les fioles T, I et II :

solution A	1,5 cm ³
solution B	1,5 cm ³
eau bi-distillée q.s.p.	5 cm ³

Agiter, laisser une demi-heure à la température du laboratoire et faire la lecture à l'électrophotomètre. (Nous avons employé la cuve de 10 mm. et un dia-

phragme réglé à 9 et une longueur d'onde correspondant au rouge.)

Calcul : Soient n , N et N' les chiffres lus sur le tambour de l'électrophotomètre pour les fioles T, I et II :

$$P \text{ minéral dans } 1 \text{ cm}^3 = (N - n) \times m.$$

P libéré par les phosphatases en unité BODANSKY :

$$(N' - N) \times m/10.$$

n représente l'absorption due à la cuve remplie avant l'apparition de la coloration bleue.

m est la variation de concentration correspondant à une division du tambour. Elle s'exprime en milligramme ou en dixième de mg. par cm^3 par exemple. Le calcul de m s'effectue une fois pour toutes pour une cuve, un écran donné et pour les réactifs que l'on vient de préparer : c'est la moyenne de 4 à 5 déterminations faites sur des concentrations différentes et connues.

Pour ce faire on prépare une solution étalon contenant 0,4 mg. de P par 5 cm^3 (80 mg. par litre).

Préparation de la solution étalon :

Faire dissoudre 0,3509 g. de phosphate monopotassique pur dans l'eau bi-distillée, verser dans un flacon gradué à 1 litre, ajouter 10 cc. de SO_4H_2 10 N, compléter à 1 litre avec de l'eau bi-distillée (pour plus de précision : dissoudre 3,509 g. de phosphate monopotassique dans 100 cc. de H_2O bi-distillée et mettre 10 cc. de cette solution dans le flacon gradué).

Conservation indéfinie.

0,1 cc. de cette solution contient 0,008 mg./l. de phosphore.

On prépare deux autres solutions en mettant par exemple :

— 30 cc. de solution étalon dans 70 cc. d'eau ; 0,1 cc. de cette solution contient 0,0024 mg. de P ;

— 80 cc. de solution étalon dans 20 cc. d'eau ; 0,1 cc. de cette solution contient 0,0064 mg. de P.

*
**

Malheureusement les réactifs A et B, surtout le B, ne sont pas particulièrement stables. Très rapidement il se produit une réduction de l'intensité de la coloration du complexe phosphomolybdique *pour une même dose de phosphore*. Il s'ensuit qu'il faut très souvent recalculer le facteur m qui dépend de l'éta-lonnage.

Aussi nous avons préféré reprendre les réactifs employés dans la méthode de BRIGGS. Ce fait est sans importance, seules les conditions d'hydrolyse et non le mode de dosage sont significatives.

Réactif molybdique :

Dissoudre 25 g. de molybdate d'ammonium dans 300 cc. d'eau bi-distillée.

Ajouter la solution :

SO⁴H² concentré : 75 cc.,
eau bi-distillée, 125 cc.

Solution aqueuse d'hydroquinone à 1 p. 100 plus
1 goutte de SO⁴H² concentré pour éviter l'oxydation.
A renouveler tous les mois.

Solution aqueuse de sulfite de sodium à 20 p. 100.

Quand on a centrifugé et décanté dans les fioles T.
I et II, on ajoute de ces trois solutions :

solution molybdique	1 cc.
solution d'hydroquinone	1 cc.
solution de sulfite de Na	1 cc.
eau bi-distillée q.s.p.	5 cc.

On lit 30 minutes après comme dans la méthode
précédente.

CHAPITRE III

RESULTATS DES DOSAGES

Les recherches ont montré qu'à l'état normal les taux de calcium et de phosphore sont sensiblement constants chez toutes les espèces. Quant aux phosphatases, les données normales sont loin d'être complètes chez les animaux ; de plus les résultats ne sont comparables que pour des méthodes et des techniques semblables.

Pour le calcium, chez le chien, LIEGEOIS et DERIVAUX citent des taux allant de 100 à 125 mg. par litre avec une moyenne de 114 mg./l.

Pour le phosphore minéral, les chiffres cités proviennent de la méthode de BELL et DOISY :

chiens au-dessous de 8 mois : 50 à 75 mg. my 67

chiens au-dessus de 8 mois : 45 à 65 mg. my 54

Nous n'avons pas trouvé d'auteurs donnant des taux de phosphatases chez le chien en unité BODANSKY.

Les résultats des dosages publiés par BARNES et MUNKS après enquêtes chez l'enfant donnent comme normales les activités phosphatasiques suivantes :

enfants de 0 à 1 an : 9,6 U. BODANSKY.

Une enquête de l'Institut de Recherches d'hygiène donne les taux suivants :

enfants de 4 à 6 ans : 4,6 U.B.,
pour les adultes : 1,3 U.B.

Nous ne citons ces chiffres que pour mémoire en rappelant qu'il est normal de comparer, en général, la physiologie d'un jeune chien de quelques mois à celle d'un enfant de 3 à 6 ans.

Ces bases étant rappelées, nous allons envisager les résultats de nos dosages :

1° Les observations faites sur des chiens adultes, ayant toutes les apparences de la bonne santé.

2° Sur de jeunes chiens présentés à la clinique de l'Ecole.

Sur ceux-ci, chaque fois qu'il nous a été possible de le faire, nous avons renouvelé régulièrement nos examens, en général tous les quinze jours, en pratiquant un test complémentaire (à notre avis indispensable pour juger de la valeur de la méthode et des résultats qu'elle donne) : après chaque prise de sang nous administrons au sujet une dose de vitamine D₃ à raison de 500 U.I. par kilog de poids vif et par jour calculée pour quinze jours.

A. — Observations faites sur des chiens adultes.

Avant d'entreprendre des dosages de phosphatémie sur des chiens susceptibles de présenter des

signes de carence ou de pré-carence, nous nous sommes efforcé d'en préciser le taux chez des chiens adultes présentant toutes les apparences de la bonne santé et recevant une nourriture saine et équilibrée.

Grâce à l'obligeance de l'Institut Mérieux, nous avons pu prélever du sang sur deux séries de chiens servant à la préparation de sérum homologue contre la maladie de **CARRÉ**.

Les prises de sang ont été faites le matin à jeun. Pour chaque sujet nous avons fait trois prises de sang espacées de huit jours.

Une première série comprenant six chiens âgés de 2 à 6 ans, de race et de sexe différents, a donné les résultats suivants :

1^{re} prise de sang :

Calcium	de 103 à 118 mg./l.
Phosphore	de 22 à 34 mg./l.
Phosphatase U. BONDANKY)	de 0,2 à 0,8 U.B.

8 jours plus tard :

Calcium	de 88 à 118 mg./l.
Phosphore	de 22 à 34 mg./l.
Phosphatases	de 0,2 à 2,6 U.B.

15 jours plus tard :

Calcium	de 98 à 128 mg./l.
Phosphore	de 24 à 40 mg./l.
Phosphatases	de 0,8 à 1,2 U.B.

Dans une deuxième série de six chiens appartenant au même chenil et présentant toujours la même diversité, nous avons trouvé les taux suivants :

1^{re} prise de sang :

Calcium	de 83 à 123 mg./l.
Phosphore	de 37 à 66 mg./l.
Phosphatases	de 0,6 à 1,6 U.B.

8 jours plus tard :

Calcium	de 88 à 103 mg./l.
Phosphore	de 26 à 54 mg./l.
Phosphatases	de 0,8 à 1,6 U.B.

Ainsi nos dosages personnels nous donnent les moyennes suivantes, chez le chien adulte :

Calcium	103 mg./l. de plasma
Phosphore	35 mg./l.
Phosphatases	0,9 U. BODANSKY

Pour les phosphatases, le taux varie de 0,2 U.B. à 2,6, ce qui correspond à peu près aux chiffres donnés par l'Institut de Recherches d'Hygiène.

B. — Observations faites sur des jeunes chiens.

Dans notre travail, qui porte sur l'étude de la phosphatasémie chez le jeune chien, nous chercherons à déterminer d'abord quel est le taux normal chez le sujet en bonne santé, sans état de pré-carence.

Il n'est pas facile de délimiter un cas de pré-carence d'un cas normal ; d'ailleurs cette union

même de pré-carence implique une absence totale de signes cliniques.

Même les tests courants, comme la radiographie, appliqués pour le dépistage des ostéo-dystrophies, sont défaillants.

D'après MEUNIER, l'augmentation de l'activité phosphatasique du plasma, si elle se manifeste au cours de nombreuses ostéopathies, se retrouve constamment et apparaît précocement dans le pré-rachitisme.

Nous avons donc essayé de classer nos résultats d'après ces données et aussi d'après les anomalies de la calcémie et de la phosphatémie.

Pour notre part, voici les cas où nous n'avons décelé rien d'anormal, seulement un taux de phosphatasémie légèrement supérieur à ce que nous avons trouvé chez l'adulte. Ce qui semble normal, le jeune animal étant en pleine construction osseuse.

Sujet I : Berger allemand, 6 mois, très bon état d'entretien, pas de signe clinique, alimentation abondante : viande, légumes, os.

Calcémie	138 mg./l.
Phosphorémie	47 mg./l.
Phosphatasémie	3 U.B.

Sujet II : Chien de taille moyenne, genre griffon vendéen, mâle, 5 mois, alimentation surtout à base de féculents, reçoit cependant un peu de lait et des os de temps en temps :

Calcémie	138 mg./l.
Phosphorémie	80 mg./l.
Phosphatasémie	3,25 U.B.

Sujet III : Berger allemand, mâle, 2 mois et demi, alimentation correcte, a été traité depuis une quinzaine de jours pour rachitisme (?), a reçu du vitascorbol et de l'huile de foie de morue :

— Le 5 janvier 1951 :

Calcémie	110 mg./l.
Phosphorémie	56 mg./l.
Phosphatasémie	1,4 U.B.

— 4 jours plus tard nous avons pu faire une nouvelle prise de sang qui a donné :

Calcémie	138 mg./l.
Phosphorémie	52 mg./l.
Phosphatasémie	0,6 U.B.

Sujet IV : Berger allemand, femelle, 4 mois, nourrit à la viande de cheval et soupes de légumes :

Calcémie	103 mg./l.
Phosphorémie	58 mg./l.
Phosphatasémie	2,4 U.B.

Sujet V : Setter irlandais, mâle, 7 mois, aucun renseignement sur la nourriture :

Calcémie	148 mg./l.
Phosphorémie	72 mg./l.
Phosphatasémie	1,5 U.B.

Sujet VI : Berger allemand, femelle, 3 mois et demi, nourriture, viande, os, soupes, un peu de lait :

Calcémie	118 mg./l.
Phosphorémie	60 mg./l.
Phosphatasémie	0,6 U.B.

En faisant la moyenne de ces quelques dosages, nous trouvons une phosphatasémie de 1,80 U.B. avec des taux allant jusqu'à 3,25 U.B.

C. — Effet d'une dose unique de vitamine D sur la phosphatasémie.

Pour étudier l'effet d'une dose unique de vitamine D, il faut toujours avoir présent à l'esprit l'extrême rapidité d'action de la vitamine. Il est certain qu'un bon nombre de contradictions relevées dans la littérature sont liées au fait que le facteur temps n'est pas pris en considération, et que l'intervalle qui sépare l'examen du sang de l'administration de la vitamine n'est que très rarement noté.

MAGON et SCHIMOTOVI (1942) notent chez le chien, après 20.000 U.I./kg, une hypercalcémie et une hyperphosphorémie dès la quatrième heure.

SHOHL rappelle que chez l'animal rachitique des modifications histologiques sont visibles dès les premières 24 heures et qu'après 48 heures il y a des pénétrations vasculaires extensives.

Nous avons fait les observations suivantes :

I. — Berger allemand, femelle, 2 mois et demi, première prise de sang faite à 11 heures :

Calcémie	153 mg./l.
Phosphorémie	105 mg./l.
Phosphatasémie	5,7 U.B.

Le sujet reçoit 60.000 U.I. de D3.

Deuxième prise de sang à 18 heures :

Calcémie	168 mg./l.
Phosphorémie	88 mg./l.
Phosphatasémie	4,4 U.B.

Sur un deuxième sujet, âgé de 7 mois, nous avons fait les constatations suivantes :

Première prise de sang (28 novembre 1950) :

Calcémie	133 mg./l.
Phosphorémie	84 mg./l.

Le sujet reçoit 50.000 U.I. de D3.

Deuxième prise de sang (30 novembre 1950) :

Calcémie	270 mg./l.
Phosphorémie	27 mg./l.
Phosphatasémie	14,9 U.B.

Troisième prise de sang, six jours plus tard (6 décembre 1950) :

Calcémie	138 mg./l.
Phosphorémie	80 mg./l.
Phosphatasémie	13,2 U.B.

Dans ces deux exemples, nous constatons bien une hypercalcémie suivant de très près l'injection parentérale de vitamine D3, mais nous ne constatons pas l'hyperphosphorémie notée par MAGON et SCHIMOTOVI.

A chaque fois, la baisse du taux de phosphatase est sensible.

Le problème se pose donc de savoir ce qui est le plus important à connaître, ou de la réaction immédiate ou de la réaction à distance. Sur notre deu-

xième sujet, nous constatons huit jours après l'administration d'une dose unique de 50.000 U.I. un retour à une calcémie et à une phosphorémie presque normale, alors que la phosphatasémie est toujours en baisse sur le chiffre précédemment trouvé.

Aussi avons-nous, après administration d'une dose unique, pratiqué un examen tardif : 15 jours environ.

Beaucoup d'auteurs publient des résultats sur l'influence de la vitamine D, sur le P sanguin après ingestion. Nous avons pratiqué nos injections par voie sous-cutanée. La voie d'administration semble jouer un rôle dans les réactions humorales. D'après de nombreux auteurs, l'ingestion provoque une élévation de phosphore sérique. Nous avons constaté avec une fréquence appréciable que l'injection sous-cutanée a provoqué un abaissement paradoxal de P. On ne peut, actuellement, interpréter ces faits.

D. — Observations faites sur des chiens à phosphatasémie élevée, traités à la vitamine D3.

Dans les observations suivantes, où nous avons trouvé des taux de phosphatases élevés, nous avons poursuivi conjointement l'étude de la vitaminothérapie D, dans la mesure où les propriétaires ont bien voulu amener leur animal régulièrement. A chaque visite, nous avons fait une prise de sang, puis administré une dose de vitamine D3 * selon la technique de la dose massive unique.

(*) Nous avons employé des solutions huileuses commercialisées sous le nom de DÉTRIAMINE.

La dose administrée était calculée sur la base de 500 U.I. par kilogramme et par jour pour une durée de 15 jours environ.

Sujet I : Groenendael, femelle, 5 mois, reçoit de la viande de cheval et beaucoup de pain, présente une infection intestinale :

Première prise de sang :

Calcémie	128 mg./l.
Phosphorémie	75 mg./l.
Phosphatasémie	7,5 U.B.

Reçoit 40.000 U.I. de vitamine D3 en solution huileuse par voie sous-cutanée.

Deuxième prise de sang (15 jours plus tard) :

Calcémie	130 mg./l.
Phosphorémie	36 mg./l.
Phosphatasémie	5,3 U.B.

Sujet II : Berger allemand, mâle, 6 mois, mauvais état d'entretien, maigreur extrême, grosses articulations, plantigrade ; a été séparé de sa mère trois semaines après la naissance ; a déjà reçu de l'huile de foie de morue et du phosphate de chaux depuis un mois environ :

Première prise de sang :

Calcémie	133 mg./l.
Phosphorémie	92 mg./l.
Phosphatasémie	4,8 U.B.

Le sujet reçoit 60.000 U.I. de vitamine D3.

Deuxième prise de sang (15 jours plus tard) :

Calcémie 113 mg./l.
 Phosphorémie 72 mg./l.
 Phosphatasémie 1,76 U.B.

Sujet III : Danois, mâle. 4 mois, poids 23 kgs, présente de grosses articulations, a les oreilles tombantes et un chapelet costal très apparent.

Nous avons pu suivre l'animal assez longtemps et donnons ci-dessous le tableau de nos observations :

	Vit. D3 Dose	Ca mg./l.	P mg./l.	Phospha- tase - U.B.
30-10-50	50.000 U.I.	123	72	18
18-11-50	60.000 U.I.	123	100	15,5
1-12-50		138	88	7,04
15-12-50		135	58,6	8,4
5-1-51		120	78	7,8
19-1-51		125	44	2

A partir de la troisième visite, le propriétaire s'est opposé aux injections de vitamine D3, et a prétendu donner lui-même de l'huile de foie de morue et des phosphates de chaux.

Sujet IV : Berger allemand, 6 mois, mâle, grosses articulations, plantigrade, semble bien nourri. viande et riz.

	Vit. D3 Dose	Ca mg./l.	P mg./l.	Phospha- tase - U.B.
21-2-51	60.000 U.I.	88	30	9
7-3-51	60.000 U.I.	118	36	9,2
3-4-51	60.000 U.I.	133	46	3
18-4-51	60.000 U.I.	103	40	4,8
9-5-51	60.000 U.I.	128	32	3,5
23-5-51	60.000 U.I.	113	50	2
6-6-51	60.000 U.I.	143	40	0,9

Sujet V : Berger allemand, femelle, 4 mois et demi, grosses articulations, membres courts, a reçu un peu d'huile de foie de morue.

	Vit. D3 Dose	Ca mg./l.	P mg./l.	Phospha- tase - U.B.
16-2-51		116	92	5,2
19-2-51	40.000 U.I.	148	88	4,3
5-3-51	40.000 U.I.	93	56	2
	40.000 U.I.	98	56	2
2-4-51	40.000 U.I.	138	40	1,2
9-4-51	40.000 U.I.	118	62	1
16-4-51	40.000 U.I.	88	40	0,8
23-4-51	40.000 U.I.	98	42	0,8
30-4-51	50.000 U.I.	123	42	1
8-6-51	60.000 U.I.	143	40	1,3

Sujet VI : Berger allemand, mâle, 6 mois et demi, grosses articulations, chapelet costal, dresse mal les oreilles, alimentation sans viande, recevra régulièrement après la première visite du phosphate de chaux, une cuillerée à café chaque jour.

	Vit. D3 Dose	Ca mg./l.	P mg./l.	Phospha- tase - U.B.
15-11-50	60.000 U.I.	128	80	21,5
29-11-50	60.000 U.I.	120	52 . °	13,2
13-12-50	60.000 U.I.	118	50,4	10,8
20-12-50	60.000 U.I.	115	56	0,8
3-1-51	60.000 U.I.	98	52	0,8
17-1-51	60.000 U.I.	113	60	0,5

Sujet VII : Jeune chiot, race commune, 2 mois environ, très mauvais état d'entretien.

	Vit. D3 Dose	Ca mg./l.	P mg./l.	Phospha- tase - U.B.
15-3-51	20.000 U.I.			
11-4-51	20.000 U.I.	143	63	3,1
19-4-51	20.000 U.I.			
24-4-51	20.000 U.I.	143	40	4,4
4-5-51	20.000 U.I.			
10-5-51	20.000 U.I.			
18-5-51	20.000 U.I.	143	42	2,5
25-5-51	30.000 U.I.	108	50	1,2
4-6-51	30.000 U.I.	113	32	1,4

EFFET DE LA VITAMINOTHÉRAPIE D SUR L'ÉTAT GÉNÉRAL :

Sur tous ces chiens, après une expérimentation qui a duré 3 mois et demi et même 4 mois (cas du sujet V), nous constatons un excellent état général. Les propriétaires de ces chiens ramènent d'eux-mêmes leur animal, constatant qu'il devient « magnifique » de bonne santé.

On sait que les besoins en vitamine D dépendent étroitement du rapport Ca/P de la ration alimentaire. Ils s'élèvent lorsque ce rapport s'abaisse. On peut obtenir ainsi une bonne calcification avec un régime déséquilibré à condition d'augmenter la ration en vitamine D.

Beaucoup de nos sujets recevaient une ration sûrement déséquilibrée, mais l'apport régulier d'une dose importante (incalculablement plus élevée que la teneur normale des aliments) a non seulement pallié à un déséquilibre, mais a encore favorisé un état d'entretien général parfait.

EFFET DE LA CALCÉMIE :

Nos dosages suivant de près l'administration d'une dose unique montrent que la calcémie s'élève parfois d'une manière considérable (jusqu'à 270 mg./l.) dans les 48 heures après cette administration.

Sur les chiens à calcémie normale (sujets I et III), le taux ne varie sensiblement pas 15 jours après l'administration.

Sur les sujets à hypocalcémie, le taux se relève

pour atteindre la normale autour de 120 mg./l. (sujet IV).

Si l'on abandonne la médication, le taux de Ca se relève sensiblement pendant un certain temps (sujets III et IV) pour redevenir finalement normal.

EFFET SUR LA PHOSPHORÉMIE :

Chez presque tous nos sujets, la phosphorémie était supérieure à la normale. L'administration de vitamine D a ramené à la longue ce taux aux environs de la normale, c'est-à-dire 40 mg./l.

Cependant, chez le sujet III, nous avons vu ce taux s'élever jusqu'à 100 mg./l. après la première injection pour redescendre ensuite lentement vers la normale.

EFFET SUR LA PHOSPHATASÉMIE :

Que le taux de phosphatase soit très élevé (sujets III et VI) ou élevé (sujets I, II, IV, V) comme il est normal à cet âge, ou même bas (sujet VII), nous le retrouvons toujours en fin d'expérimentation voisin des taux trouvés chez l'adulte.

La constatation d'écarts même importants relativement aux taux en Ca et P réputés normaux, sont en général peu propre à fonder un diagnostic précis.

L'abaissement régulier du taux de phosphatase parallèlement à une amélioration de l'entretien général au cours de la vitaminothérapie D donne à penser que la détermination de ce taux est un test quasi spécifique des états de pré-avitaminose D.

CONCLUSIONS

I. — Nombreux sont, chez les jeunes chiens, les états de carence, de pré-carence en vitamine D.

Le diagnostic de ces pré-carences étant impossible avec les éléments cliniques dont on dispose habituellement, la recherche d'un test précoce et spécifique avait son importance.

La constatation d'un taux de phosphatase alcaline sérique supérieure à 6 Unités BODANSKI et l'abaissement régulier de ce taux au cours de l'administration régulière de doses thérapeutiques de vitamine D, semble constituer un test quasi spécifique de pré-avitaminose D.

II. — La phosphatasémie chez l'adulte en bon état de santé se trouve aux environs de 0,9 U.B.

III. — Chez le jeune chien, la phosphatasémie semble normale vers 1,8 U.B. avec des taux pouvant aller jusqu'à 3,25 U.B.

IV. — Quand la phosphatasémie passe 5 U.B. chez le jeune chien, nous estimons qu'il y a déjà pré-avitaminose puisque l'administration de cholécalférol ramène rapidement le taux à un voisinage de 1 U.B.

V. — Confirmant les nombreux travaux déjà publiés, nous avons constaté la grande rapidité d'action de la vitamine D sur la calcémie et sur la phosphorémie (suivant de quelques heures son administration).

VI. — En contradiction avec la plupart des auteurs, mais confirmant les travaux de M. LÉVY, nous avons observé un abaissement du phosphore minéral sérique quand la vitamine D3 est administrée par voie sous-cutanée.

Vu :
LE RAPPORTEUR,
BRION.

Vu : LE DIRECTEUR :
DE L'ECOLE VÉTÉRINAIRE,
JUNG.

Vu :
Le Doyen,
HERMANN.

Vu :
Le Président de la Thèse,
MOURIQUAND.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 19 Janvier 1953

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

BRION (A.). — La vitamine D3. *Encyclopédie Vétérinaire Périodique*, 1949, 440.

DALLEMAGNE (M.-J.). — Données récentes sur la nature et le métabolisme de l'os. *Actualités Biochimiques*, n° 2, 1945. Masson et Cie, édit., Paris.

FABRE (A.). — Les phosphatases. Intérêt de leur dosage. *Presse Médicale*, n° 41, 1950, 743.

LÉVY (M.), SAPIR (M.) et collaborateurs. — Des critères de l'action de la vitamine D. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXIX, 1947, 1.007.

LÉVY (M.), SAPIR (M.) et MIGNON (S.). — Doses massives de vitamine D2 chez l'adulte humain : reflet humoral. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXXI, 1949, 300.

LIÉGEOIS (F.). — Pathologie médicale des animaux domestiques. 3^e édition, 1949. Jules Duculot, édit., Gembloux (Belgique).

LOMER (P.-E.). — Contribution à l'étude de l'hypocalcémie dans la fièvre vitulaire. *Thèse vétérinaire*, Paris, 1935.

MEUNIER (P.) et RAOUL (Y.). — Le diagnostic chimique des avitaminoses. 1942. Masson et Cie, édit.

MOURIQUAND (G.) et LEULIER (A.). — Les vitamines anti-rachitiques. Traité de physiologie normale et pathologique, publié sous la direction de G.-H. ROGER et L. BINET. Tome XII, p. 363 et suivantes.

RANDOÏN (L.) et FOURNIER (P.). — Le dosage des vitamines D anti-rachitiques par les méthodes biologiques. *Ann. Nut. et Alim.*, 1950, vol. IV, n° 2.

Roche (J.) et Bouchiloux (S.). — Spécificité de la phosphatase alcaline. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, tome XXII, 739.

Roche (J.) et Courtois (J.). — Les phosphatases. *Exp. An. de Biol. Méd.* publiés par M. Polonowski, 1944, IV, p. 219.

Roche (J.). — La phosphatase des os. *Exp. An. de Biol. Méd.* publiés par M. Polonowski, 1942, III, p. 251.

Strandsfæct (H.) et Sjöberg (K.). — *Veterinärtidskrift Uppsala*, 1943, 641. Abst. in *Encyclopédie Vétérinaire Périodique*, 1947, n° 3-4.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
<i>Chapitre premier. — L'avitaminose D</i>	11
La vitamine D	11
L'ossification et la vitamine D	21
Facteurs externes	23
Facteurs internes	26
La phosphatase des os	26
• Tests d'avitaminose D	30
<i>Chapitre II. — Méthodes de dosage utilisés</i>	33
Dosage du calcium	33
Dosage du phosphore minéral et des phosphatases du sang	35
<i>Chapitre III. — Résultats des dosages</i>	43
A. — Chez le chien adulte en bonne santé	44
B. — Chez le jeune chien en bonne santé	46
C. — Effet d'une dose unique de vitamine D3 sur la phosphatasémie	49
D. — Observations faites sur des chiens à phos- phatasémie élevée, traités à la vitamine D3.	51
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAPHIE	61

